

Aus der Universitätskinderklinik in Marburg an der Lahn
Komm. Direktoren: Prof. Dr. med. J. Dittrich
Prof. Dr. med. U. Willenbockel

EINFLUSS VON LEVAMISOL AUF DIE INGESTION UND
NBT-REDUKTION NEUTROPHILER GRANULOCYTEN
VON WISTAR RATTEN IM IN-VIVO-VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DIETER BECKER

aus Ernsthausen

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitätskinderklinik in Marburg an der Lahn
Komm. Direktoren: Prof. Dr. med. J. Dittrich
Prof. Dr. med. U. Willenbockel

EINFLUSS VON LEVAMISOL AUF DIE INGESTION UND
NBT-REDUKTION NEUTROPHILER GRANULOCYTEN
VON WISTAR RATTEN IM IN-VIVO-VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DIETER BECKER

aus Ernsthäusen

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 24. 11. 1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr.med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr.med. C. Eschenbach

Correferent: Prof. Dr.med. C.-P. Sodomann



1.	Einleitung	1
2.	Untersuchungsmethode	4
2.1.	Geräte und Untersuchungsmaterial	4
2.2.	Versuchstiere	5
2.3.	Versuchsgruppen	5
2.4.	Durchführung der Untersuchungen	6
2.4.1.	Injektionen	6
2.4.2.	Herstellung der NBT-Lösung	6
2.4.3.	Herstellung der Staphylokokken-Suspension	6
2.4.4.	Aufbereitung der Staphylokokken-Suspension	6
2.4.5.	Ansatz (NBT-Test)	7
2.4.6.	Gewinnung des Blutes	8
2.4.7.	Inkubation und Anfertigung der Ausstrich Präparate	8
2.5.	Auswertung und Berechnung	9
3.	Ergebnisse	11
4.	Diskussion	21
4.1.	Diskussion des methodischen Teiles	21
4.2.	Diskussion der Levamisol-Wirkung auf die Phagocytose	23
4.3.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	29
5.	Zusammenfassung	32
6.	Literaturverzeichnis	34
7.	Lebenslauf	43
8.	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	44

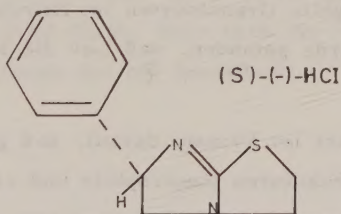
1. Einleitung

Levamisol (Lev), ein synthetisches Anthelmintikum, wirksam gegen die meisten tierischen und menschlichen Nematoden, ist schon seit einigen Jahren in der Veterinär- und Humanmedizin erfolgreich im Gebrauch.

Die Arbeitsgruppe von Renoux et al. (38) zeigte 1971 erstmalig, daß Levamisol die Immunantwort von Tieren verstärkt. In den folgenden Jahren wurde diese Eigenschaft des Levamisols mehrfach bestätigt. (9, 17, 25, 31, 52)

Levamisol, L- 2, 3, 5, 6, Tetrahydro-6-phenylimidazo (2, 1-b) thiazolhydrochlorid, ist ein Derivat des Imidazols und hat ein Molekulargewicht von 240, 75. Die Reinsubstanz ist ein stabiles, weißes, kristallines Pulver und sehr leicht wasserlöslich. (46)

Levamisol hat folgende Strukturformel:



(S)-(-)-2, 3, 5, 6, -tetrahydro-6-phenylimidazo (2, 1-b)thiazolhydrochlorid

Levamisol wurde bei dermatologischen Erkrankungen (23, 26, 29, 45, 48, 53), bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (25, 39, 48, 59) und bei chronischen persistierenden Infektionen (14, 50) klinisch erprobt. Die Arbeitsgruppe J. De Cree et al. (14) berichtet von zwei Patientinnen mit

multiplen, rezidivierenden Staphylokokken-Abszessen, ausgedehnten mykotischen und bakteriellen Hautinfektionen und chronischen Infekten des Respirationstraktes. Die bei einer der beiden Patientinnen vorgenommene Levamisol-Behandlung (Orale Gabe von 2,5 mg Levamisol an 3 von 14 Tagen über die Dauer von 1 Mon.) bewirkte ein Verschwinden sämtlicher Infektionen; die vorher pathologisch verminderte Lymphocyten-Transformation nach Candida-Stimulation wurde normal, lediglich der schon vor Beginn der Therapie erhöhte IgE Spiegel blieb gesteigert. Es zeigte sich weiterhin eine signifikante Steigerung der Phagocytose von Hefepartikeln durch neutrophile Granulocyten im autologen Serum.

Die Stimulation der Ingestion von Granulocyten und Makrophagen durch Levamisol wurde ebenfalls in zahlreichen Veröffentlichungen nachgewiesen. (12, 14, 24, 30, 31, 51, 54, 56)

W. De Cock et al. (13) untersuchten den Einfluß von Lev auf menschliche neutrophile Granulocyten im Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Test. Es wurde gefunden, daß Lev die NBT-Positivität steigert.

Der NBT-Test beruht im Prinzip darauf, daß gelbes NBT von phagocytierenden Leukocyten (neutrophile und eosinophile Granulocyten, Monocyten) durch Ingestion bzw. Diffusion aufgenommen wird und zu unlöslichem, tiefblauen NBT-Formazan reduziert wird. Der mikroskopische Nachweis von NBT-Formazan in einer Zelle zeigt, daß diese NBT sowohl aufgenommen, wie auch zu NBT-Formazan reduziert hat, also einen Reduktionsindikator darstellt. Viele Modifikationen des NBT-Tests wurden beschrieben, aber eine Trennung der NBT-Aufnahme und NBT-Reduktion ist durch sie nicht möglich. Es stellt sich die Frage, ob das positive Ergebnis der ange-

führten Arbeit von De Cock et al. (13) im NBT-Test auf einer Steigerung der NBT-Aufnahme oder -Reduktion beruht.

Unseren Untersuchungen wurde die von Eschenbach et al. (15, 16, 32) beschriebene Modifikation des NBT-Testes zugrunde gelegt.

Das Prinzip dieser Modifikation beruht darauf, daß NBT an abgetötete Staphylokokken gekoppelt (NBT-Staph.) Leukocyten zur Ingestion angeboten wird. Werden die NBT-Staph. ingestiert, jedoch das NBT nicht reduziert, erscheinen sie als grau-braune Zelleinschlüsse. Nach erfolgter Reduktion des NBT stellen sich die NBT-Staph. in lichtblauer Farbe dar.

Somit wird eine Differenzierung von NBT-Aufnahme (Ingestion) und NBT-Reduktion ermöglicht.

Unter Verwendung des NBT-Testes sollte im in-vivo-Versuch an Ratten untersucht werden, ob Lev ausschließlich die Ingestion von NBT-Staph. oder auch die NBT-Reduktion oder beide Funktionen der NG beeinflusst.

2. Methode

2.1. Geräte und Untersuchungsmaterial

- Polystyrolröhrchen, 84 mm, Innendurchmesser 14 mm
(Sarstedt, Nümbrecht)
 - 1 ml Einmal-Tuberkulinspritzen (Fa. Asiki/S, Denmark)
 - 10 ml und 5 ml Einmal-Spritzen (Fa. Braun, Melsungen)
 - 1er - Einmalkanülen und 24 G 1 - Injektionskanülen
(Fa. Braun, Melsungen)
 - Staphylococcus aureus, Stamm SG511 1.)
 - p-Nitroblau-Tetrazolium (NBT) (Firma Serva/Heidelberg)
 - Heparin (Hoffmann-LaRoche AG, Basel), ca. 160 IE/mg
 - Chloroform (zur Analyse)
 - L-Ripercol (Levamisol) (L-2, 3, 5, 6-tetrahydro-6-phenyl-
imidazo- (2,1-b)-thiazol-hydrochlorid)
(R 12 564 levamisole, Janssen Pharmaceutica, Beerse,
Belgien) 2.)
- Levamisol ist als L-Ripercol in folgender Lösung im Handel:
- 20 mg Citronensäure
- 2 mg NaHSO_3
- NaOH quant. sat. ad. pH 3,7
- 1,3 mg Titriplex III

-
- 1.) Herrn Prof. Dr. W. Schiff, Hygiene Institut der Philipps-
Universität Marburg/L sei an dieser Stelle für die Her-
stellung und Überlassung der Staphylokokken-Suspension
gedankt.
 - 2.) Der Firma Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien, danke
ich, mir das L-Ripercol (Levamisol) zur Verfügung gestellt
und die Kosten für die Anschaffung der Versuchstiere über-
nommen zu haben.

1,3 mg Methyl-p-oxybenzoesäure

0,2 mg Propyl-p-oxybenzoesäure

Aqua quant. sat. pro 1 ml

Die Konzentration des Levamisol in der verwendeten Lösung beträgt 100 mg/ml

- Lösungsmittel des L-Ripercol

L-Ripercol wurde in 0,15 m NaCl-Lsg. im Verhältnis 1:100 verdünnt (=L-Ripercol-Verdünnung), in gleicher Weise erfolgte die Verdünnung des Lösungsmittels (=Lösungsmittelverdünnung)

2.2. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an jungen, männlichen, ca. 250 g schweren Wistar-Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) durchgeführt. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C in Einzelkäfigen gehalten. Als Nahrung der Ratten diente Altromin-Standard-Diät, Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung.

2.3. Versuchsgruppen

Es wurden drei Versuchsgruppen mit jeweils 10 unausgewählten Wistar-Ratten gebildet:

Gruppe A (Untersuchungsgruppe)

Zur Injektion wurde 0,6 ml L-Ripercol-Verdünnung verwendet.

Pro Injektion wurden 2,5 mg Levamisol/kg Körpergewicht verabreicht.

Gruppe B (Kontrollgruppe I)

Appliziert wurde 0,6 ml Lösungsmittel-Verdünnung

Gruppe C (Kontrollgruppe II)

0,6 ml sterile, phys. Na Cl-Lsg. wurde injiziert

2.4. Durchführung der Untersuchungen

2.4.1. Injektionen

Die Injektionen wurden wechselseitig nach Alkoholdesinfektion in die Glutealmuskulatur mit Tuberkulin-Spritzen (24er-Kanülen) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im zeitlichen Abstand von 24 h bei dem jeweiligen Tier vorgenommen. 24 h nach der letzten Injektion erfolgte die Tötung des Versuchstieres.

2.4.2. Herstellung der NBT-Lösung

20 mg Nitroblau-Tetrazolium wurden in 3 ml phosphat-gepufferter NaCl-Lsg. (pH=7,2) unter Erwärmung auf 37°C aufgelöst. Die so gewonnene Lösung wurde anschließend filtriert (Filter Nr.595, Hersteller: Fa. Schleicher und Schüll, Dassel)

2.4.3. Herstellung der Staphylokokken-Suspension

Staphylococcus aureus SG 511 wurde in einer Glucose-Bouillon während 24 h bei 37°C kultiviert, anschließend erfolgte die Hitzeabtötung der Erreger bei 65°C für die Dauer von 30 Minuten. Die Endkonzentration der abgetöteten Bakterien betrug 10^{11} - 10^{12} /ml Suspension. Bis zum Gebrauch wurde die Bakteriensuspension in 8 ml Polystyrolröhrchen eingefroren und bei -14°C gelagert.

2.4.4. Aufbereitung der Staphylokokkensuspension

Die gefrorene Staphylokokkensuspension wurde unmittelbar vor Beginn der Staphylokokkenaufbereitung in einem Wasserbad bei ca. 35°C getaut. Es erfolgte dann eine zweimalige Waschung der Staphylokokken durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 U/min, Dekantierung und Resuspension in 2,5 ml

einer phosphatgepufferten 0,15 m NaCl-Lösung (pH=7,2). Dann wurden die Staphylokokken nach einem dritten Zentrifugationsvorgang in NBT-Lösung suspendiert. Das Sediment von 16 ml Staphylokokken-Suspension wurde mit 1 ml NBT-Lösung versetzt und während 60 Min. bei 37°C inkubiert. Um die Anzahl der NBT-Staph./Volumeneinheit zu bestimmen, wurden jeweils 0,1 ml der Suspension mit phosphatgepuffelter NaCl-Lsg. im Verhältnis 1:20 verdünnt und in einer Neubauer Kammer die Zahl der NBT-Staph/mm³ NBT-Staph. Suspension bestimmt. Es ergab sich, daß die im weiteren Versuch verwendete NBT-Staph. Suspension $2-4 \times 10^9$ NBT-Staph/ml Susp. enthielt.

2.4.5. Ansatz (NBT-Test)

Um ein unterschiedliches Angebot von NBT-Staphylokokken pro neutroph. Granulocyten im Versuchsansatz berechnen zu können, war die Kenntnis der Zahl der NG im durch Herzpunktion gewonnenen Blutes der Versuchstiere erforderlich. Zur Vermeidung jeglicher unnötiger Blutverluste wurde eine Bestimmung der Zahl der NG im Blut eines jeden Tieres nicht vorgenommen, stattdessen wurde bei 3 Ratten desselben Stammes und der gleichen Gewichtsklasse die Zahl der NG im Blut bestimmt und der Mittelwert berechnet. Dieser Wert wurde zur Berechnung der Angebote zugrunde gelegt. Später erfolgte die Korrektur an Hand der für jedes einzelne Tier bestimmten Zahl der NG.

Zur Berechnung des Volumens der zuzusetzenden NBT-Staph. Suspension dienten als Ausgangswerte die angenommene Zahl der NG/ml Blut und die bestimmte Zahl der NBT-Staph/1 ml NBT-Staph. Suspension bei Zugrundelegung von 0,5 ml Vollblut pro Versuchsansatz. Ansätze mit den Angeboten 10, 20, 40, 60 und 100 NBT-Staph/NG wurden berechnet.

Die für jeden Ansatz bestimmte Menge der NBT-Staph. Suspension wurde in Polystyrolröhrchen pipettiert und gepufferte NaCl-Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 0,25 ml zugesetzt.

2.4.6. Gewinnung des Blutes

Die jeweilige Versuchsratte wurde in einem geschlossenen Plastikgefäß, in dem sich Chloroform getränkter Zellstoff befand, narkotisiert. Nach Thorakotomie wurde durch Herzpunktion mit einer 5 ml Einmal-Spritze (1er Kanüle) ca. 5 ml Blut gewonnen und in einem Polystyrolröhrchen mit 0,3 mg Heparin vermischt.

2.4.7. Inkubation und Anfertigung der Ausstrich-Präparate
0,5 ml heparinisiertes Blut wurde in jedes der vorbereiteten Inkubationsröhrchen pipettiert, gut durchmischt und in einem Wärmeschrank (Temp. 37°C) für die Dauer von 30 Min. inkubiert. Die Röhrchen wurden während dieser Zeit bei geringer Schräglage mit ca. 50 U/min. um die Längsachse rotiert. Nach der 30 minütigen Inkubationsdauer wurden von jedem Ansatz drei dünne, gleichmäßige Blutausriche angefertigt. Diese wurden 24 Stunden luftgetrocknet und ungefärbt mit Eukitt eingedeckt.

Mit dem restlichen Blut wurde ein Differentialblutbild (Färbung nach Pappenheim) angefertigt und die Leukocyten mit einem Celloscope gezählt (3-fache Zählung). Aus dem Mittelwert der drei-fachen Leukocytenzählung und dem Anteil der NG, bestimmt aus dem Differentialblutbild, wurde die absolute Zahl der NG/ml errechnet und für die endgültige Berechnung des Angebotes verwendet.

2.5. Auswertung und Berechnung

Die Ausstriche wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop bei Verwendung von Ölimmersion (Vergrößerung 1:800) ausgewertet. Vom Ausstrichende beginnend wurden an beiden seitlichen Rändern des Präparates 50 intakte, unausgewählte NG beurteilt. In einzelnen Ausstrichen gelang es - infolge starker Ingestion und dadurch bedingter mechanischer Zerstörung der Zellen - nicht, 100 NG zu beurteilen. Werte, die durch weniger als 100 NG ermittelt wurden, wurden durch (x) markiert.

Basophile wie eosinophile Granulocyten und Monocyten, die durch Form und Granulierung gut von den NG abzugrenzen waren, blieben unberücksichtigt. Lymphocyten wurden ebenfalls von der Beurteilung ausgeschlossen.

Bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung waren die ingestierten NBT-Staph., deren NBT reduziert worden war, als runde, gleichmäßig große, blaue Einschlußkörperchen des Cytoplasmas, z.T. in Vakuolen gelegen, zu identifizieren. Die von den NG aufgenommenen, nicht reduzierten NBT-Staph. zeigten eine grau-braune Farbe. Zahl der ingestierten NBT-Staph. und Zahl der NBT-Staph., deren NBT reduziert worden war, wurden für jede einzelne Zelle bestimmt. NG, die nicht ingestiert hatten, wurden ebenfalls registriert.

Aus den ermittelten Werten wurden folgende Parameter errechnet:

- 1.) Ingestionsindex = Zahl der durch 100 NG ingestierten NBT-Staphylokokken (NBT-Staph./100 NG)
- 2.) Reduktionsindex = Zahl der durch 100 NG reduzierten NBT-Staph., bezogen auf die Zahl der durch 100 NG in-

gestierten NBT-Staph. (%)

3.) Anteil der an der Ingestion beteiligten NG (%)

4.) Reduktionsindex bei definiertem Ingestionsindex (%)

Zusätzlich wurde bestimmt:

5.) Abhängigkeit der Zahl der Leukocyten/mm³ und der
Zahl der neutrophilen Granulocyten/mm³ von der
Gabe des Lev im Vergleich zu den Kontrollgruppen

Um innerhalb jeder Gruppe und zwischen den Gruppen untereinander vergleichen zu können, wurden die Werte 1.), 2.), 3.) für die Angebote 10-20-40-60-100 numerisch interpoliert. Ebenso erfolgte Interpolation der Werte von 4.) jeweils für die definierten Ingestionsindices 400, 1000, 2000 und 3000 NBT-Staph./100 NG.

Mittelwert und Standardabweichung der Werte von 1.) - 5.) jeder Versuchsgruppe wurden errechnet und mit Hilfe des Student-t-Testes die Signifikanz der Differenzen der Ergebnisse zwischen den drei Versuchsgruppen geprüft.

3. Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abb. 1 - 5 und Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Unabhängig von der injizierten Lösung - L-Ripercol-Verdünnung, Lösungsmittel-Verdünnung bzw. NaCl-Lösung - steigen mit wachsendem Angebot von NBT-Staph./NG in allen untersuchten Gruppen der Ingestionsindex, der Reduktionsindex sowie der Anteil der ingestierenden NG (Abb. 1, 2 und 3, Tab. 1a-c).

1. Ingestionsindex

Lev-Applikation steigert unter den genannten Bedingungen die Ingestion von NBT-Staph. durch NG signifikant gegenüber beiden Kontrollgruppen. Es besteht keine Signifikanz der Differenzen zwischen beiden Kontrollgruppen. (Abb. 1, Tab. 1a, 2a).

2. Reduktionsindex

In den Bereichen des Angebotes < 100 NBT-Staph./NG zeigen die Reduktionsindices der drei untersuchten Gruppen keine Signifikanz der Differenzen (Abb. 2, Tab. 1b, 2b).

3.) Anteil der an der Ingestion beteiligten NG

Auch der Anteil der ingestierenden NG zeigt in fast allen gewählten Bereichen des Angebotes von NBT-Staph./NG keine signifikante Abweichung bei den untersuchten Gruppen (Abb. 3, Tab. 1c, 2c).

4.) Reduktionsindex bei def. Ingestionsindex

Für die in den 3 untersuchten Gruppen zugrunde gelegten gleichen definierten Ingestionsindices von 400, 1000, 2000 und 3000 NBT-Staph./100 NG ergeben sich keine

signifikant unterschiedlichen Reduktionsindices
(Abb. 4, Tab. 1d, 2d).

- 5.) Zahl der Leukocyten/mm³ und Zahl der neutrophilen
Granulocyten/mm³ der drei Versuchsgruppen

Lev zeigt in der beschriebenen Versuchsanordnung
lediglich eine geringe - nicht signifikante Verminderung
der Zahl der Gesamtleukocyten und der Zahl der NG
(Abb. 5, Tab. 1e, 2e).

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlußfolgerungen
ziehen:

Levamisol-Applikation bei Ratten bewirkt im Vergleich zu den
Kontrollgruppen eine Steigerung der Ingestion der neutrophilen
Granulocyten von NBT-Staphylokokken.

Dagegen wird die NBT-Reduktionskapazität der neutrophilen
Granulocyten durch Levamisol nicht beeinflußt.

Levamisol zeigt keinen Einfluß auf die Zahl der Leukocyten
und eine nur geringe - jedoch nicht signifikante - Verminderung
der Zahl der neutrophilen Granulocyten.

Tab. la-e

a. Angebot (NBT-Staph./NG)

Versuchs- gruppe	10	20	40	60	100
A	924, 3 ⁺ -460, 5	1622, 2 ⁺ -582, 9	2825, 9 ⁺ -836, 5	3865, 9 ⁺ -982, 36	4973, 3 ⁺ -1180, 6
B	438, 3 ⁺ -142, 4	915, 4 ⁺ -434, 5	1638 ⁺ -440, 4	2461, 2 ⁺ -551, 5	3390 ⁺ -549, 9
C	398, 3 ⁺ -62, 7	767, 5 ⁺ -156, 6	1433, 8 ⁺ -327, 9	2123, 3 ⁺ -571, 2	3206, 1 ⁺ -646, 6

b. Angebot (NBT-Staph./NG)

Versuchs- gruppe	10	20	40	60	100
A	87, 59 ⁺ -10, 80	91, 86 ⁺ -8, 68	93, 95 ⁺ -7, 30	96, 88 ⁺ -3, 06	98, 58 ⁺ -1, 11
B	84, 12 ⁺ -12, 29	89, 77 ⁺ -8, 64	93, 27 ⁺ -5, 68	94, 70 ⁺ -4, 08	96, 24 ⁺ -2, 90
C	82, 75 ⁺ -11, 35	83, 04 ⁺ -22, 36	87, 32 ⁺ -17, 50	91, 38 ⁺ -14, 63	94, 26 ⁺ -11, 34

c. Angebot (NBT-Staph./NG)

Versuchs- gruppe	10	20	40	60	100
A	94, 88 ⁺ 9, 2	97, 46 ⁺ 4, 996	99, 71 ⁺ 0, 54	100 ⁺ 0	100 ⁺ 0
B	85, 44 ⁺ 11, 88	92, 56 ⁺ 9, 30	99, 14 ⁺ 1, 44	99, 92 ⁺ 0, 25	100 ⁺ 0
C	84, 49 ⁺ 9, 86	92, 58 ⁺ 5, 54	97, 11 ⁺ 2, 58	98, 77 ⁺ 1, 77	100 ⁺ 0

d. Ingestionsindex (NBT-Staph./100 NG)

Versuchs- gruppe	400	1000	2000	3000
A	83, 95 ⁺ 13, 0	88, 44 ⁺ 9, 69	92, 51 ⁺ 7, 70	94, 70 ⁺ 5, 75
B	84, 56 ⁺ 10, 92	91, 08 ⁺ 7, 13	93, 95 ⁺ 4, 76	95, 82 ⁺ 3, 56
C	76, 82 ⁺ 23, 6	86, 96 ⁺ 14, 79	91, 41 ⁺ 11, 32	95, 35 ⁺ 7, 71

e.

Versuchs- gruppe	Leuco./mm ³	NG/mm ³
A	8636,3 $\pm$ 1184,3	1661,7 $\pm$ 375,48
B	9496,5 $\pm$ 2307,7	2232,7 $\pm$ 1240,8
C	7549,8 $\pm$ 1751,7	2056,9 $\pm$ 1037,2

Tab. 1a-e: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) der Ingestionsindices (a), der Reduktionsindices (b) und des Anteils der an der Ingestion beteiligten NG (c) in Abhängigkeit von dem Angebot der NBT-Staph./NG, der Reduktionsindices bei definierten Ingestionsindices (d) und der Zahl der Leucocyten/mm³ und der NG/mm³ (e) der Gruppe A (Untersuchungsgruppe), der Gruppe B (Kontrollgruppe I) und der Gruppe C (Kontrollgruppe II).

Tab. 2a-e

a.

Angebot (NBT-Staph. /NG)

Verglichene Versuchsgruppen	10	20	40	60	100
A - B	ss	ss	ss	ss	ss
A - C	ss	sss	sss	sss	sss
B - C	ns	ns	ns	ns	ns

b.

Angebot (NBT-Staph. /NG)

Verglichene Versuchsgruppen	10	20	40	60	100
A - B	ns	ns	ns	ns	s
A - C	ns	ns	ns	ns	ns
B - C	ns	ns	ns	ns	ns

c.

Angebot (NBT-Staph. /NG)

Verglichene Versuchsgruppen	10	20	40	60	100
A - B	ns	ns	ns	ns	ns
A - C	s	ns	ss	ns	ns
B - C	ns	ns	ns	ns	ns

d.

Ingestionsindex (NBT-Staph. /100NG)

Verglichene Versuchsgruppen	400	1000	2000	3000
A - B	ns	ns	ns	ns
A - C	ns	ns	ns	ns
B - C	ns	ns	ns	ns

e.

Verglichene Versuchsgruppen	Leuco./mm ³	NG/mm ³
A - B	ns	ns
A - C	ns	ns
B - C	ns	ns

Tab. 2a-e: Signifikanzen der Differenzen der Mittelwerte der Ingestionsindices (a), der Reduktionsindices (b) und des Anteils der an der Ingestion beteiligten NG (c) in Abhängigkeit von dem Angebot der NBT-Staph./NG, der Reduktionsindices bei definierten Ingestionsindices (d) und der Zahl der Leucocyten/mm³ und der NG/mm³ (e) zwischen der Gruppe A und der Gruppe B, zwischen der Gruppe A und der Gruppe C und zwischen der Gruppe B und der Gruppe C.

Student-t-Test

$p > 5\%$: ns, $5\% \geq p > 1\%$: s, $1\% \geq p > 0,1\%$: ss,

$p \leq 0,1\%$: sss

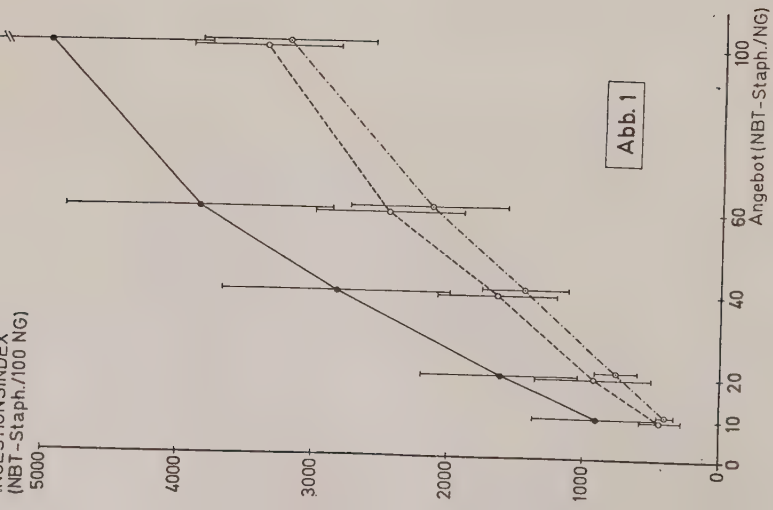


Abb. 1

Abb. 1: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) der Ingestionsindices in Abhängigkeit von dem Angebot der NBT-Staph./NG der Gruppe A (Untersuchungsgruppe) (—), der Gruppe B (Kontrollgruppe I) (-----) und der Gruppe C (Kontrollgruppe II) (-.-.-.-).

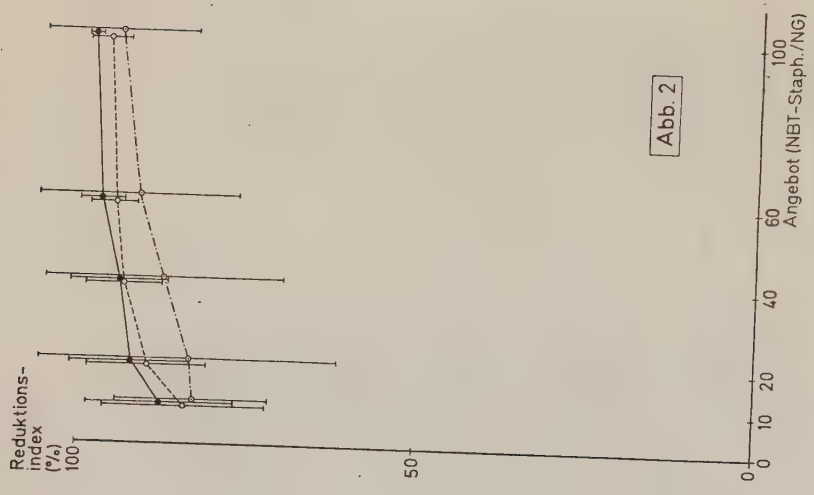


Abb. 2

Abb. 2: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) der Reduktionsindices in Abhängigkeit von dem Angebot der NBT-Staph./NG der Gruppen A, B und C (vgl. Abb. 1).

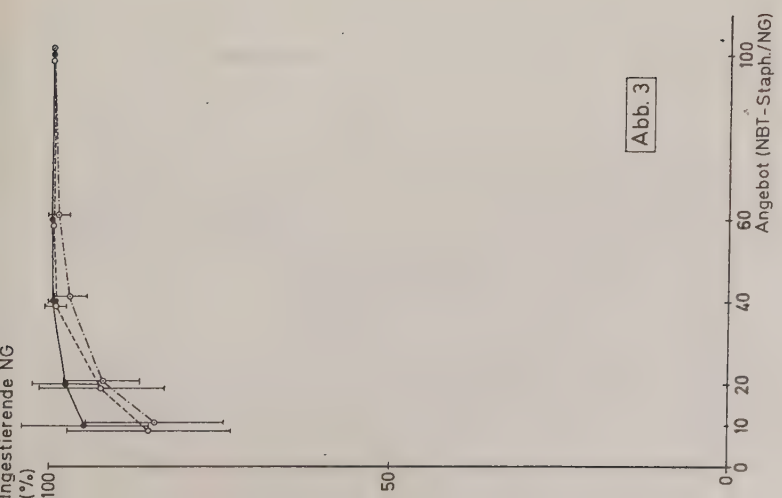


Abb. 3

b. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) des Anteils der an der Ingestion beteiligten NG in Abhängigkeit von dem Angebot der NBT-Staph./NG der Gruppen A, B und C (vgl. Abb. 1).

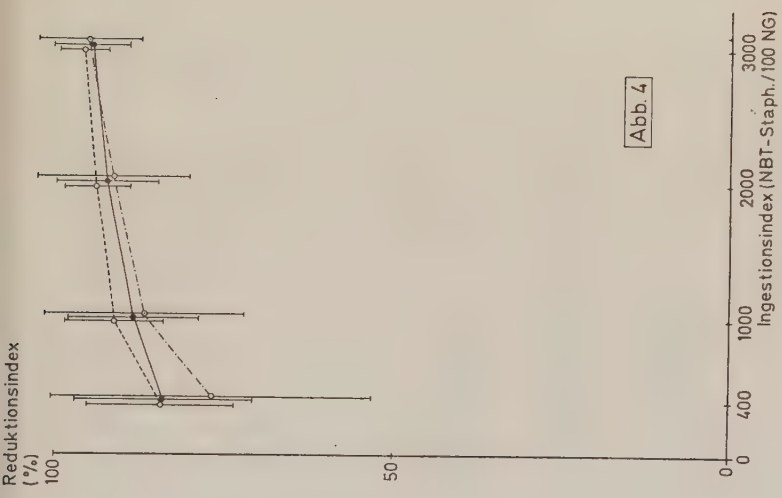


Abb. 4

Abb. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) der Reduktionsindices bei definierten Ingestionsindices der Gruppen A, B und C (vgl. Abb. 1).

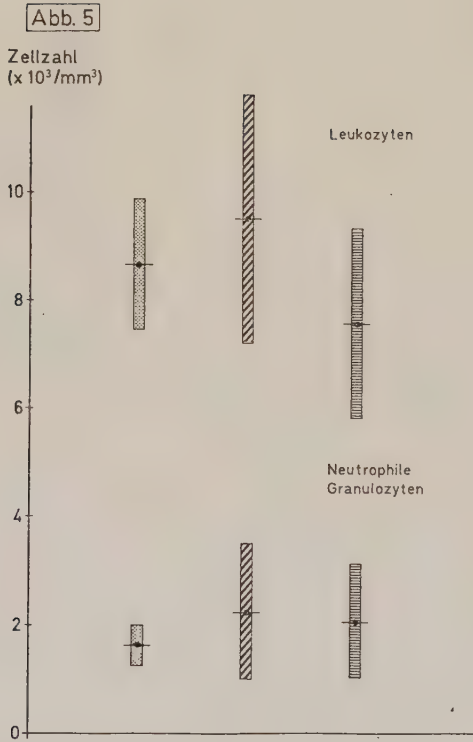


Abb. 5: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$ SD) der Zahl der Leukocyten/ mm^3 und der neutrophilen Granulo-
cyten/ mm^3 der Gruppe A (Untersuchungsgruppe) ,
der Gruppe B (Kontrollgruppe I)  und der
Gruppe C (Kontrollgruppe II) 

4. Diskussion

4.1. Diskussion des methodischen Teiles

Nach den Angaben von Symoens (47) kam bei den vorliegenden Untersuchungen eine Injektionsdosis von 2,5 mg Levamisol/kg Körpergewicht der Wistar Ratte zur Anwendung und die Injektion dieser Dosis geschah jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im zeitlichen Abstand von 24 Stunden.

Versuche über Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden nicht durchgeführt. Die Injektionen wurden intramuskulär vorgenommen. Gemäß den Angaben der Literatur (24, 31, 41, 51, 56) erfolgte 24 Stunden nach der letzten Injektion die Tötung der jeweiligen Versuchsratte und die Blutgewinnung. Die Versuchstiere wurden in Chloroformnarkose nach Thorakotomie durch Herzpunktion getötet. Meines Wissens gibt es in der Literatur keine Angaben über eine Ingestionsbeeinflussung durch Chloroform. Mit dem durch Herzpunktion gewonnenen Blut wurde dann die von Eschenbach et al. (15) beschriebene Modifikation des NBT-Testes vorgenommen.

Der NBT-Test beruht im Prinzip darauf, daß gelbes NBT von phagocytierenden Leukocyten durch Ingestion und/oder Diffusion aufgenommen wird und zu unlöslichem, tiefblauen NBT-Formazan reduziert wird. Der mikroskopische Nachweis von blauem NBT-Formazan in einer Zelle zeigt deren 'NBT-Positivität' an, d.h., daß diese NBT aufgenommen und zu NBT-Formazan reduziert hat. Die NBT-Positivität kann durch in-vitro und in-vivo-Stimulation der Leukocyten gesteigert werden. Durch Ingestion von Latex Partikeln (5, 6, 18, 28, 58), Zymosan (19), Candida Partikeln (37), oder ingestionsunabhängig durch die Einwirkung von Endotoxin (34, 36) bzw. in-vivo durch akute bakt. Infektionen (15, 35)

stimulierte Leukocyten zeigen im Vergleich zu nichtstimulierten (28, 35, 58) eine signifikant höhere NBT-Positivität. In diesen zahlreich beschriebenen Modifikationen des NBT-Testes ist eine Trennung der NBT-Aufnahme und NBT-Reduktion nicht möglich. Die unseren Untersuchungen zugrunde gelegte Modifikation des NBT-Testes ermöglicht eine Differenzierung von NBT-Ingestion und NBT-Reduktion, da NBT an abgetötete Staphylokokken gekoppelt den Leukocyten zur Ingestion angeboten wird. Werden die NBT-Staph. nur ingestiert, zeigen sie eine grau-braune Farbe; erfolgt NBT-Reduktion, so erscheinen sie blau. Um ein unterschiedliches Angebot von NBT-Staph./NG berechnen zu können, ist es erforderlich, die Zahl der NG im zu untersuchenden Blut zu kennen. Abweichend von der üblichen Durchführung dieses NBT-Testes wurden zur Vermeidung zu großer Blutverluste der Versuchstiere bei drei Wistar-Ratten der gleichen Gewichtsklasse durch Mehrfachbestimmungen die Mittelwerte der Zahl der NG im Venenblut bestimmt. Diese Werte wurden als vorläufige Ausgangswerte der erforderlichen Angebotsberechnung für die vorgesehenen Versuche zugrunde gelegt. Später erfolgte für die endgültige Berechnung die Korrektur an Hand der für jedes einzelne Tier bestimmten Zahl der NG. Es wurden die Angebote gegenüber der ursprünglichen Methode um den Wert 100 NBT-Staph./NG erweitert.

Bei der Beurteilung der Ausstrichpräparate im Phasenkontrastmikroskop waren die NG im ungefärbten Präparat eindeutig zu identifizieren. Die Kerne der NG zeigten die für Ratten typische Ringform.

Aus methodischen Gründen blieb die Ingestions- und NBT-Reduktionsfähigkeit der Monocyten und Eosinophilen unberücksichtigt.

4.2. Diskussion der Levamisol-Wirkung auf die Phagocytose
Levamisol findet in der Veterinärmedizin schon seit einigen Jahren als Anthelminthikum Anwendung. Renoux et al. (38) beschrieben 1971 erstmalig, daß Lev die Immunantwort von Tieren verstärkt. Der Einfluß von Lev auf das Immunsystem wurde durch mehrere Untersuchungen bestätigt. (14, 49, 52). Tripodi et al. (49) und Verhaegen et al. (52) fanden, daß im Tuberkulin-Test und DNCB-Test nach Lev Behandlung signifikant mehr Carcinompatienten ein positives Testergebnis aufwiesen. De Cree et al. (14) berichten, daß die pathologisch verminderte Lymphocyten-Transformation auf Candida-Stimulation bei einer Patientin nach Lev-Therapie normale Werte zeigte.

Im Laufe der vielfältigen Untersuchungen seit der Entdeckung von Renoux et al. (38) stellte sich heraus, daß Lev auch einen Einfluß auf die Phagocytosefähigkeit der Leukocyten ausübt. Die Phagocytosebeeinflussung durch Lev wurde in-vivo am Menschen oder Tier (Ratten, Mäuse) und in-vitro an separierten Granulocyten und Makrophagen untersucht.

Hoebeke (24) und van Ginckel (51) kamen zu dem gleichen Ergebnis, daß Levamisol, bei CD_1 -Mäusen appliziert, die Makrophagen zu verstärkter Phagocytose von Kohlepartikeln stimulieren kann, denn die Kohlepartikel-Clearance war bei den Mäusen signifikant erhöht, die Lev erhalten hatten.

Van Ginckel (51) konnte aus dem Serum der mit Lev behandelten Tiere eine hitzelabile, dialysierbare Substanz isolieren, die in der Lage ist, die Phagocytose von Kohlepartikeln durch Makrophagen zu steigern.

Schulze (41) berichtet, daß bei Mäusen Impfung mit hitze-inaktivierten Salmonellen und zusätzliche Levamisolgabe

zu einer verstärkten Phagocytose der Peritonealmakrophagen (PM) führte, verglichen mit den nur geimpften oder unbehandelten Tieren.

In-vitro-Versuche an PM bestätigen ebenfalls den Levamisol-effekt. Versijp et al. (56) fanden, daß nach eintägiger Levamisol-Behandlung von SPF-Mäusen in-vitro der Prozentsatz an PM, die Staph. albus ingestierten und die Anzahl der ingestierten Bakterien pro PM signifikant anstieg.

Auch Mäusemakrophagen ingestierten sensibilisierte Schaf-Erythrocyten in Gegenwart von Lev in erhöhtem Maße (30).

Mehrere Autoren prüften den Einfluß von Lev auf die Phagocytose von neutrophilen Granulocyten (12, 14, 17, 26, 31). Ippen (26) stellte fest, daß der Anteil der an der Phagocytose beteiligten NG bei Patienten mit Hauterkrankungen (M. Reiter, Akne conglobata, veget. Pyodermie) während der Levamisol-Gabe erheblich gesteigert war.

De Cree et al. (14) berichten von zwei Patientinnen mit multiplen, rezidivierenden Staphylokokken-Abszessen, ausgedehnten mykotischen und bakteriellen Hautinfektionen und chronischen Infekten des Respirationstraktes. Beide wiesen einen hohen IgE Spiegel (> 3500 U/ml), geringe Eosinophile und pathologisch verminderte Lymphocyten-Transformation auf Candida-Stimulation auf. Eine Patientin wurde mit Levamisol behandelt und unter der Therapie kam es zu einem Verschwinden sämtlicher Infektionen, die Lymphocyten-Transformation nach Candida-Stimulation wurde normal, lediglich der IgE Spiegel blieb gesteigert. Im autologen Serum war die Phagocytose von Hefepartikeln durch NG gesteigert. Die zweite Patientin blieb zunächst unbehandelt. Von ihr ent-

nommenes Vollblut wurde mit 10^{-5} - 10^{-7} M Lev inkubiert und es zeigte sich wiederum eine Steigerung der Ingestion von Hefepartikeln durch NG. Gab man Lev nur zum autologen Serum dieser Patientin, so war keine Wirkung auf die Phagocytose der NG zu beobachten. Die Autoren nehmen einen durch Levamisol aktivierten Serumfaktor an, der eine Steigerung der Phagocytose bewirken soll.

Möse (31) setzte Ratten künstliche Hautinfektionen mit Staph. Oxford. Tiere, die Lev erhielten, zeigten eine höhere Zahl durch NG ingestierte Erreger im Präparat des Wundabstriches als die unbehandelten.

Zu differenten Ergebnissen kam De Cock et al. (12) durch in-vitro-Versuche an menschlichen NG. Lev verminderte bei einer Konzentration von 10^{-3} - 10^{-5} M den Anteil der NG, die sich an der Ingestion von Latex Partikeln beteiligten, dagegen stieg die Anzahl ingestierter Latex Partikel/NG signifikant bei 10^{-3} M bzw. sank bei 10^{-5} M.

Ebenfalls abweichend von den bisher zitierten Arbeiten (14, 26, 31) konnte von Fischer et al. (17) in in-vitro-Versuchen eine verstärkte Phagocytose nicht demonstriert werden, wenn Ratten-NG mit Lev inkubiert wurden.

Einen Beitrag zur Klärung der Levamisol Wirkung gaben Carel (10) und Anderson et al. (4).

Von Carel (10) wurde gezeigt, daß Lev den Kontaktwinkel zwischen einem Tropfen gepufferter Salzlösung und einem Makrophagen vermindert; d.h. größere Hydrophilie der Makrophagen bewirkt (46), und dies ist mit einer Aktivierung der Phagocytose von Staph. aureus verbunden.

Anderson et al. (4) stellten fest, daß Lev die Motilität der NG stimuliert. Sowohl die gerichtete Bewegung der NG auf Endotoxin aktiviertes Serum und auf hydrolisiertes Casein als auch die 'random motility' wurden gesteigert, möglicherweise führt die Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration durch Lev dazu.

Mit der biochemischen Wirkung des Levamisol beschäftigten sich Lima et al. (30), Hadden et al. (21) und Sunshine et al. (44). Die Untersuchungen zeigten übereinstimmend, daß Levamisol und Imidazol die cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität steigern, das wiederum bewirkt einen verstärkten Abbau des cAMP zu AMP, der cAMP-Spiegel sinkt infolgedessen. In antagonistischer Weise hemmt Lev die cGMP-Phosphodiesterase; der cGMP-Spiegel steigt an.

Hadden (21) und Sunshine (44) kommen zu dem Schluß, daß die Hauptwirkung des Levamisol als 'Immunpotentiator' in seiner Fähigkeit besteht, die durch cGMP vermittelte Induzierung der Lymphocytenproliferation zu beeinflussen.

Lima (30) meint, daß die Phagocytose durch Drogen gefördert wird, welche den cAMP-Gehalt von Makrophagen herabsetzen. Er hat sich in seiner Untersuchung allerdings auf den cAMP Nachweis beschränkt, cGMP blieb unberücksichtigt.

De Cock (13) und Fischer et al. (17) erklären die Wirkung von Lev in ähnlicher Weise. Zwei Hypothesen der Lev-Wirkung auf die Phagocytose von NG und Makrophagen stehen einander folglich gegenüber:

1. Levamisol stimuliert die NG und Makrophagen direkt zur Ingestion und Digestion.

2. Levamisol stimuliert die Lymphocyten (vor allem T-Lymph.) zu verstärkter Bildung von chemotakt. Faktoren und Lymphokinin - wie auch zur Bildung von Interferon - und beeinflusst damit die Ingestion und Digestion von NG und Makrophagen indirekt.

Neben der durch Levamisol gesteigerten Ingestionsfähigkeit von Makrophagen und neutrophilen Granulocyten, ist die Beeinflussung der intrazellulären Digestionsvorgänge von nicht geringerem Interesse. Zu diesem Problem liegen unterschiedliche, z.T. im Ergebnis gegensätzliche Angaben vor.

Versijp et al. (56) geben an, daß nach eintägiger Levamisol-Behandlung von Mäusen in-vitro die Phagocytose von vitalen Staph. albus der PM zwar signifikant anstieg, jedoch war die intrazelluläre Abtötung der Erreger nicht erhöht.

In-vitro-Versuche von De Cock et al. (13) zeigten im NBT-Test eine gesteigerte NBT-Positivität der NG durch Levamisol.

Von diesem Ergebnis abweichend berichtet Verhaegen (55), daß im NBT-Test in NG ein "Trend zu niedrigeren Werten" zu beobachten wäre, obwohl Levamisol eine geringe Steigerung der Phagocytose von Candida- und Latex-Partikeln im autologen Serum bewirkte.

Griscellis (20) Beschreibung von drei Patienten mit septischer Granulomatose, bei denen ein Therapieversuch mit Lev vorgenommen und ein NBT-Test ausgeführt wurde, läßt ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse erkennen. Die in zwei Fällen gesteigerte NBT-Positivität der NG liegt innerhalb der Grenzen, die auch ohne Behandlung bei dieser Krankheit beobachtet werden. Diese angeführten Beobachtungen geben keine Antwort auf die Frage, ob Levamisol neben der Ingestionssteigerung

auch die intrazellulären Digestionsvorgänge (bzw. die NBT-Reduktion) beeinflusst. Die verwendeten Methoden lassen eine Trennung der beiden Leukocytenfunktionen NBT-Ingestion und NBT-Reduktion nicht zu. Eine Aussage kann deswegen nicht gemacht werden, ob die differenten Ergebnisse des NBT-Testes als eine Folge unterschiedlicher NBT-Aufnahme oder unterschiedlicher NBT-Reduktionskapazität der NG bedingt sind.

4.3. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modifikation des NBT-Testes ist eine getrennte Beurteilung der NBT-Ingestion und -Reduktion möglich (vgl. Diskussion des method. Teiles), da nicht frei gelöstes NBT, sondern an hitzegetötete Staphylokokken gebundenes NBT den NG als Phagocytat angeboten wird. Die Ingestionsfähigkeit der NG kann dabei über die Gesamtzahl der ingestierten Bakterien und die NBT-Reduktionsfähigkeit durch den Anteil von NBT-Staph., deren NBT reduziert wurde in Relation zu der Gesamtzahl der ingestierten NBT-Staph., getrennt beurteilt werden.

NG der Ratten der Untersuchungsgruppe ingestierten NBT-Staph. signifikant stärker als die der Tiere beider Kontrollgruppen. Levamisol in der angegebenen Menge von 2,5 mg/kg Körpergewicht bewirkt in allen ausgewählten Angeboten von NBT-Staph./NG eine Steigerung der Ingestion um ca. 100% im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Die NBT-Reduktionsindices der Untersuchungsgruppe waren geringfügig höher als die der Kontrollgruppen, eine Signifikanz der Differenzen bestand aber nicht. Die Ingestion von Partikeln kann den oxidativen Stoffwechsel der NG stimulieren und sich somit auf die NBT-Reduktion auswirken. Um diesen Faktor zu umgehen, wurden die NBT-Reduktionsindices bei definierten, in allen drei Versuchsgruppen gleichen Ingestionsindices errechnet. Für die zugrunde gelegten gleichen, definierten Ingestionsindices ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Reduktionsindices; d.h., daß Lev keinen Einfluß auf die Reduktionskapazität der NG ausgeübt hat.

Der Anteil der an der Ingestion beteiligten NG zeigte ebenfalls keine signifikante Abweichung bei den untersuchten Gruppen. Möglicherweise ist die nur geringfügige Steigerung des Anteils der ingestierenden NG der Untersuchungsgruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen durch die Differenz zwischen angenommener Zahl der NG zur Berechnung der Angebote NBT-Staph./NG und tatsächlich vorhandener Zahl der NG im Rattenblut und dem dadurch erforderlichen numerischen Extrapolationsvorgang bedingt. Weitere Faktoren, die den Unterschied zu den normalen Ergebnissen bei der Untersuchung dieses Parameters im menschlichen Blut erklären, können die verwendete Tierspecies und die zweimaligen Injektionstraumen bilden.

Aus all diesen Angaben wird ersichtlich, daß Levamisol die Ingestionsfähigkeit der NG steigert, die NBT-Reduktionskapazität aber unbeeinflußt läßt. Das Lösungsmittel dieses Medikamentes hat keinen Einfluß auf die angeführten Parameter.

Die in-vitro-Untersuchungen von W. Hahm (22) an menschlichen NG unterstützen im Prinzip die vorliegenden Ergebnisse. Er fand ebenfalls eine signifikante Steigerung der Ingestionsindices der NG durch Lev. Die Reduktionsindices bei def. Ingestionsindices der Untersuchungsgruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Signifikanz der Differenzen, daraus folgt, daß Lev auch die Reduktionskapazität menschl. NG unbeeinflußt läßt. Abweichend von meinen Ergebnissen konnte Hahm im niedrigen Angebotsbereich von NBT-Staph./NG eine signifikante Steigerung der Reduktionsindices der Untersuchungsgruppe nachweisen, außerdem war der Anteil der an der Ingestion beteiligten NG durch

Lev signifikant erhöht.

Es ist durch die vorliegenden Untersuchungen nicht möglich eine Aussage zu machen, wie die Stimulation der NG erfolgt. Die Ergebnisse von in-vitro-Untersuchungen (Hahm (22)) sprechen für eine direkte Wirkung von Lev auf die phagocytierenden NG und gegen eine indirekte Wirkung durch Stimulation der Synthese von Opsoninen z.B.. Das kurze Zeitintervall der Levamisol-Gabe spricht ebenfalls gegen einen immunologischen Einfluß des Lev auf die NBT-Staph.-Ingestion und NBT-Reduktion.

Der von Trabert (48) und Rosenthal (39) beobachtete Leukocytotoxische Effekt des Lev bei der Behandlung entzündlich rheumatischer Erkrankungen, konnte durch meine Versuche nicht bestätigt werden, möglicherweise waren Applikationsdauer und verabreichte Dosis zu gering, um diese Erscheinungen erkennbar zu machen.

5. Zusammenfassung

In in-vivo-Untersuchungen wurde der Einfluß von Levamisol auf die Ingestion und NBT-Reduktion der neutrophilen Granulocyten des Vollblutes von Wistar Ratten geprüft.

Folgende Versuchsgruppen von je 10 Tieren wurden gebildet:

- 1.) Untersuchungsgruppe: Injektion von L-Ripercol in einer Verdünnung von 1:100 mit 0,15 m gepufferter NaCl-Lsg. entsprechend 2,5 mg Levamisol/kg Körpergewicht
- 2.) Kontrollgruppe I: Injektion von Lösungsmittel des L-Ripercol in einer Verdünnung von 1:100 mit 0,15 m gepufferter NaCl-Lsg.
- 3.) Kontrollgruppe II: Injektion von 0,15 m gepufferter NaCl-Lsg.

In allen drei Versuchsgruppen erfolgte die Applikation durch zweimalige intramuskuläre Injektion im zeitlichen Abstand von 24 Std. Die Injektionsmenge war bei den Tieren aller Versuchsgruppen gleich. 24 Std. nach der letzten Injektion erfolgte die Tötung eines jeden Versuchstieres und die Blutgewinnung in Chloroformnarkose nach Thorakotomie mittels Herzpunktion. Die weiteren Untersuchungen wurden mit einer Modifikation des NBT-Testes in allen drei Versuchsgruppen identisch durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß Levamisol in der gewählten Versuchsanordnung eine signifikante Steigerung der Ingestion in allen Angeboten von Phagocytat bewirkte. Ebenfalls wurde gefunden, daß die NBT-Reduktion entsprechend der durch

Levamisol gesteigerten Ingestion erhöht war. Die Betrachtung der NBT-Reduktion bei gleichen, konstanten Ingestionswerten erwies keine Differenz der Ergebnisse, das bedeutet, daß Levamisol in der gewählten Versuchsanordnung keinen Einfluß auf den oxidativen Stoffwechsel der neutrophilen Granulocyten ausgeübt hat.

Die vorliegenden Ergebnisse des Einflusses von Levamisol auf die Ingestion durch neutrophile Granulocyten des peripheren Blutes im in-vivo-Versuch stehen in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Untersuchungsergebnissen anderer Autoren.

Der Einfluß von Levamisol auf die NBT-Reduktion - unter Berücksichtigung der Wirkung dieser Substanz auf die Ingestion - wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmalig bearbeitet, deswegen ist ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren nicht möglich.

6. Literaturverzeichnis

1.) Amery, W.:

Letters to the Editor: Levamisole - Double-Blind Evaluation
of Levamisole in Patients with Bronchogenic Carcinoma
Lancet I, 389 (1975)

2.) Amery, W.:

Side-Effects in Patients on Levamisole and Patients on
Placebo
Lancet I, 574 (1975)

3.) Amery, W.:

Double-Blind Trial with Levamisole in Respectable Lung
Cancer
Presentet at the 9th International Congress of Chemo-
therapy,
London, July 1975

4.) Anderson, R.; Glover, A.; Koornhof, H.J.; Rabson, P.:

In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole:
Maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated
levamisole treated neutrophils
J. Immunol. 117, 428-432 (1976)

5.) Baehner, R.L.; Nathan, D.G.:

Deficient Glucose Oxidation in the Intact Leucocytes of
Chronic Granulomatous Disease
Blood 28, 1010-1011 (1966)

6.) Baehner, R.L.; Nathan, D.G.:

Leucocyte Oxidase: Defective Activity in Chronic Granulo-
matous Disease
Science 155, 835-836 (1967)

- 7.) Baehner, R.L.; Nathan, D.G.:
Quantitative Nitroblue Tetrazolium Test in Chronic
Granulomatous Disease
New Engl. J. Med. 278, Nr. 18, 971-976 (1968)
- 8.) Borgers, M.:
The Cytochemical Application of New Potent Inhibitors
of Alkine Phosphatases
J. Histochem. Cytochem. 21, Nr. 9, 812-824 (1973)
- 9.) Brugmans, J.; Schuermans, V.; De Cock, W.;
Thienpont, D.; Janssen, P.; Verhaegen, H.; Van Nimmen,
L.; Louwagie, A.C.; Stevens, F.:
Restoration of host defense mechanism in man by levamisole
Life Sci. 13, 1499-1504 (1973)
- 10.) Carel, J.; van Oss, C.J.:
Effect of Levamisole on Contact Angle and on Phagocytosis
by Macrophages
Persönliche Mitteilung
- 11.) Chirigos, M.A.; Pearson, J.W. and Pryor, J.:
Augmentation of Chemotherapeutically Induced Remission
of a Murine Leucemia by a Chemical Immunoadjuvant
Cancer Res. 33, 2615 (1973)
- 12.) De Cock, W.; De Cree, J.; Verhaegen, H.:
The effect of levamisole on phagocytosis of latex particles
by human neutrophils in vitro
Persönliche Mitteilung
- 13.) De Cock, W.; Verhaegen, H.; De Cree, J.:
The effect of levamisole in vitro on the nitro-blue
tetrazolium reduction to formazan by polymorphonuclear
neutrophils
Persönliche Mitteilung

- 14.) De Cree, J.; Verhaegen, H.; De Cock, W.; Vanheule, R.;
Brugmans, J.; Schuermans, V.:
Impaired neutrophil phagocytosis
Lancet II, 294-295 (1974)
- 15.) Eschenbach, C.; Seebach, G.u.Müller-Lissner, St.:
Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionskapazität von neutro-
philen Granulocyten
Klin. Wschr. 53, 1049-1056 (1975)
- 16.) Eschenbach, C.; Büdenbender, B.:
Ingestions- und NBT-Reduktionskapazität neutrophiler
Granulocyten bei Trisomie 21
Klin. Wschr. 54, 1147-1151 (1976)
- 17.) Fischer, G.W.; Podgore, J.K.; Bass, J.W.;
Wagner, F.S.; Kelley, J.L.:
Enhancement of host defense mechanism against gram
positive pyogenic coccal infections with levo-tetra-
misole (levamisole) in neonatal rats
Ann.Alergy 33, 193-198 (1974)
- 18.) Gifford, R.H.; Malawista, S.E.:
A simple rapid micromethod for detecting chronic
granulomatous disease of childhood
J.Lab. Clin.Med. 75, 511-519 (1970)
- 19.) Gifford, R.H.; Malawista, S.E.:
The Nitroblue Tetrazolium Reaction in Human Granulo-
cytes Adherent to Surface
Yale J. Biol.Med. 43, 119-132 (1972)
- 20.) Griscelli, C.:
Traitement des deficits immunitaires congenitaux par
le levamisole
Persönliche Mitteilung

21. Hadden, J.W.; Coffey, R.G.; Hadden, E.M.; Lopez-Corrales, E.; Sunshine, G.H.:

Effect of levamisole and imidazole on lymphocyte
Proliferation and cyclic nucleotide levels
Cell.Immunol. 20, 98-103 (1975)

- 22.) Hahm, W.:

Der Einfluß von Levamisol auf die Ingestion und die
Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionskapazität humaner
neutrophiler Granulocyten im in-vitro-Versuch
Dissertation, Marburg/L. (1978)

- 23.) Helin, D.; Berg, M.:

Letter: Levamisole for warts
New Engl. J.Med. 291, 1311 (1974)

- 24.) Hoebeke, J.; Franchi, G.:

Influence of Tetramisole and its Optical Isomers on
the Mononuclear Phagocytic System-Effect on
Carbon Clearance in Mice
J. Reticuloendothel. Soc. 14, 317-323 (1973)

- 25.) Huskisson, E.C.:

Immunostimulant Therapy with Levamisole for Rheuma-
toid Arthritis
Lancet I, 393-395 (1976)

- 26.) Ippen, H.:

Levamisol zur Behandlung von Hautkrankheiten
Dtsch.Med.Wschr. 100, 1710-1711 (1975)

- 27.) Janssen Research Products Information Service

Safety evaluation of levamisole. Review of available
data

Persönliche Mitteilung

- 28.) Kim, S.K.; Monz, E. u. Wehinger, H.:
NBT-Test. Ein neues Hilfsmittel für die Diagnostik
bakterieller Infektionen
Klin. Pädiat. 185, 141-146 (1973)
- 29.) Kint, A.; Verlinden, L.:
Letter: Levamisole for Recurrent Herpes Labialis
New Engl. J. Med. 291, 308 (1974)
- 30.) Lima, A.O.; Javierre, M.Q.; Dias da Silva, W.;
Sette Camara, D.:
Immunological Phagocytosis: Effect of Drugs on
Phosphodiesterase Activity
Experientia 30, 945-946 (1974)
- 31.) Möse, J.R.:
Brief an Dr. J. Symoens, Janssen Pharmaceutica
vom 13.5.1974
Persönliche Mitteilung
- 32.) Müller-Lissner, St.; Eschenbach, C.; Viemann, E.:
Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionskapazität neutrophiler
Granulocyten im Nabelschnurblut und im Blut Gebärender
Klin. Wschr. 54, 1153-1155 (1976)
- 33.) Niethammer, E.D.; Kleihauer, E.:
Nitroblautetrazolium-Test und -Index
Dtsch. Med. Wschr. 41, 2071 (1974)
- 34.) Ochs, H.D.; Igo, R.P.:
The NBT slide test: A simple screening method for
detecting chronic granulomatous disease and female
carriers
J. Pediat. 83, 77-82 (1973)

- 35.) Park, B.H.; Fikring, S.M.; Smithwick, E.M.:
Infection and Nitroblue-Tetrazolium Reduction by
Neutrophils
Lancet I, 532-534 (1967)
- 36.) Park, B.H.; Good, R.A.:
Letter: NBT-Test stimulated
Lancet II, 616 (1970)
- 37.) Preisig, E.; Hitzig, W.:
Nitroblue-Tetrazolium Test for the Detection of
Chronic Granulomatous Disease - Technical Modification
Europ.J. Clin. Invest. 1, 409-412 (1971)
- 38.) Renoux, G.; Renoux, M.:
Effet Immunostimulant d'un Imidothiazole dans
L'Immunsation des Souris Contre L'Infection par
Brucella Abortus
C.R. Acad.Sci. (Paris) 2720, 349-350 (1971)
- 39.) Rosenthal, M.:
Leucocytotoxic Effect of Levamisole
Lancet I, 369 (1976)
- 40.) Schulze, H.J.:
Testung von Levamisol auf seine abwehrsteigernde
Wirkung im Mäuseschutzversuch
Persönliche Mitteilung
- 41.) Schulze, H.J.; Raetting, H.J.:
Steigerung der Aktivität von Peritonealmakrophagen der
Maus durch Levamisol
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 622-623 (1973)

- 42.) Shaffer, J.M.; Kucera, C.J.; Spink, W.W.:
The Protection of Intracellular Brucella against
Therapeutic Agents and the Bactericidal Action of Serum
J.Exp. Med. 97, 77-89 (1953)
- 43.) Study Group for Bronchogenic Carcinoma (Chairman:
Amery, W.):
Immunopotential with Levamisole in Resectable
Bronchogenic Carcinoma: A Double-Blind controlled Trial
Brit. Med. J. 3, 461-464 (1975)
- 44.) Sunshine, G.; Lopez-Corrales, E.; Hadden, E.M.;
Coffey, R.G.; Wanebo, H.; Hadden, J.W.:
Levamisole and Imidazole: In vitro Effects in Mouse
and Man and their possible Mediation by Cyclic
Nucleotides
In 'Second International Conference on Modulation of
Host Immune Resistance in the Prevention or Treatment
of Induced Neoplasia'
(Ed. M.A. Chirigos, Fogarty International Center
Proceedings, US Government Printing Office, Washington,
DC., USA, in press)
- 45.) Symoens, J.; Brugmans, J.:
Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis and Herpes
with Levamisole
Brit. Med. J. 4, 592 (1974)
- 46.) Symoens, J.; Brugmans, J.:
The effect of levamisole on host defence mechanism -
A review
In 'Second International Conference on Modulation of Host
Immune Resistance in the Prevention or Treatment of
Induced Neoplasia'
(Ed. M.A. Chirigos, Fogarty International Center
Proceedings, US Government Printing Office, Washington,
DC., USA, in press)

- 47.) Symoens, J.:
Persönliche Mitteilung
- 48.) Trabert, U.; Rosenthal, M.; Müller, W.; Müller, S.;
Wurm, K.:
Levamisol bei der Behandlung entzündlich-rheumatischer
Erkrankungen und der Sarkoidose
Dtsch. Med. Wschr. 44, 2297 (1975)
- 49.) Tripodi, D.; Parks, L.C.; Brugmans, J.:
Drug induced restoration of cutaneous delayed hyper-
sensitivity in anergic patients with cancer
New Engl. J. Med. 289, 354-357 (1973)
- 50.) Van Eygen, M.:
Levamisole in Prevention of Recurrent Upper-Respiratory-
Tract Infections in Children
Lancet I, 382-385 (1976)
- 51.) Van Ginckel, R.F.; Hoebecke, J.:
Carbon Clearance Enhancing Faktor in Serum from
Levamisole treated Mice
J. Reticuloendothel. Soc. 17, 65-72 (1975)
- 52.) Verhaegen, H.; Verbruggen, F.; Verhaegen-Dedercq,
M.L.; De Cree, J.:
Effets du lévamisole sur les réactions cutanées
d'hypersensibilité retardée
Nouv. Presse Med. 3 (38-40), 2483-2485 (1974)
- 53.) Verhaegen, H.; De Cree, J.; Brugmans, J.:
Letter: Treatment of Aphthous Stomatitis
Lancet II, 842 (1973)

- 54.) Verhaegen, H.; De Cree, J.; De Cock, W.; Verhaegen, F.:
Letter: Levamisole and the immune response
New Engl. J. Med. 289, 1148-1149 (1973)
- 55.) Verhaegen, H.:
The effect of levamisole on host defence mechanisms.
Survey of available clinical evidence
Persönliche Mitteilung
- 56.) Versijp, G.; van Zwet, Th.L.; van Furth, R.:
Levamisole and functions of peritoneal macrophages
Lancet I, 798 (1975)
- 57.) Wachi, K.; Hokama, Y.:
Mechanism of Levamisole Effect on Warts
New Engl. J. Med. 292 (9), 483 (1975)
- 58.) Wehinger, H.; Kim, S.K.:
Untersuchungen mit einem cytochemischen NBT-Test
Z. Kinderheilk. 114, 175-190 (1973)
- 59.) Yaron, M.:
Levamisole in Rheumatoid Arthritis
Lancet I, 369 (1976)

7. Lebenslauf

Am 15. Oktober 1953 wurde ich, Dieter Becker, als erstes Kind des Land- und Forstwirtes Karl Becker und seiner Ehefrau Elisabeth Becker, geb. Briel, in Ernsthausen (jetzt Burgwald-Ernsthausen) geboren. In meinem Heimatort Ernsthausen besuchte ich von 1960 bis 1964 die Volksschule, anschließend von 1964 bis 1969 die Burgwaldschule (Realschule) in Frankenberg/E., welche ich mit der Mittleren Reife abschloß. Dann folgte von 1969 bis 1972 der Besuch des Gymnasiums Edertalschule in Frankenberg/E., das ich mit dem Abitur erfolgreich beendete.

Im Herbst 1972 begann ich das Medizinstudium an der Philipps Universität in Marburg und legte im August 1974 die ärztliche Vorprüfung nach dem 4. Semester, weiterhin nach dem 2. Klinischen Semester im Sommer 1975 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Nach dem 6. Klinischen Semester beendete ich im Sommer 1977 erfolgreich den 2. Abschnitt des Staatsexamens nach der neuen Approbationsordnung für Ärzte. Im Oktober 1978 werde ich voraussichtlich nach Abschluß des Praktischen Jahres den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegen.

8. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer in Marburg:

Amon, Arndt, Baltzer, Bode, Braasch, Buchholz, Castenholz, Daume, Dennhardt, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Ehrhardt, Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich, Gallwitz, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Goßmann, Graul, Grundner, Haberich, Habermehl, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hensel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Jakob, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kessler, Klaus, Klein, Kleine, Kleinsasser, Knauff, Koch, Koranski, Knoll, Kuni, Lange, Lauer, Lehmann F.-G., Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarrat, Müller Kh., Neurath, Niemeyer, Oepen I., Petry, Pohlen, Portig, Pots, Priebe, Riecken, Rodeck, Rohen, Schacht-schabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt M., Schmitz-Moormann, Schneider, Schulte-Hermann, Schwick, Seifart, Siegert, Siegrist, Slenczka, Sodomann, Solcher, Straub, Sturm, Stutte, Weber, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Wiegandt, Willenbockel

Mein besonderer Dank gebührt

Herrn Prof. Dr.med. C. Eschenbach

für die freundliche Überlassung des Themas
der Doktorarbeit sowie für seine ständige
Hilfsbereitschaft.

